

Aus der Hämatologischen Abteilung
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. Gerhartz)
der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin.
(Direktor: Professor Dr. med., Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c.,
Dr. med. h. c. Hans Freiherr v. Krefß)

Zur Methode der mikroskopischen Untersuchung vitalfluochromierter Ergüsse

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1963

vorgelegt von

Hans-Reinhard Thom
aus Berlin

Aus der Hämatologischen Abteilung (Leiter: Priv.-Doz.Dr.Gerhartz)
der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr v. K r e ß)

ZUR METHODE DER MIKROSKOPISCHEN UNTERSUCHUNG VITALFLUOCHROMIERTER
ERGÜSSE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Hans-Reinhard T h o m
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Heinrich G e r h a r t z

Korreferent: Professor Dr. med. Herbert H e r x h e i m e :
Professor Dr. med. Wilhelm M a ß h o f f

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14. Mai 1963

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
A. Einleitung	1
B. Methodik	8
C. Klinische Ergebnisse	14
D. Zusammenfassung	18
E. Literaturverzeichnis	19
F. Bildteil *	22
G. Lebenslauf	32

Ein Original der Arbeit mit Farbphotographie
liegt bei der Fakultät.

A. Einleitung

Nachdem über ein halbes Jahrhundert die Fluoreszenzmikroskopie fast ausschliesslich den theoretischen Naturwissenschaften vorbehalten blieb, begegnet diese Methodik in den letzten Jahren zunehmend ärztlichem Interesse. Entscheidend hierfür waren besondere Eigentümlichkeiten fluorochromierter Carzinomzellen, die - von der pathologischen Anatomie her entdeckt - Anlass zu eingehenden Untersuchungen vornehmlich auf gynäkologisch-cytologischem Gebiet gaben. So wurde es in der Tumordiagnostik möglich, durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Punktatausstrichen bei relativ geringem Aufwand bereits wenige Minuten nach der Entnahme dieses Materials es ohne die Inanspruchnahme medizinisch-technisch ausgebildeter Hilfskräfte auszuwerten.

Unter Fluoreszenz wird heute die Eigenart zahlreicher organischer und anorganischer Verbindungen verstanden, aufgenommenes sogenanntes Erregerlicht unter Verlängerung der Wellenlänge als Fluoreszenzlicht wieder auszustrahlen. Es handelt sich dabei im Gegensatz zu elektrisch oder chemisch erzeugter Fluoreszenz um das Energieäquivalent des absorbierten Lichtes. Jede Fluoreszenz besitzt eine gewisse Trägheit; sie setzt nicht sofort mit der erregenden Belichtung ein und aus, sondern folgt mit einer Verzögerung, die zwar häufig kurz, jedoch immer wesentlich länger als die Schwingungsdauer des Lichtes ist. Trägheit sowie Frequenzänderung der Wellenlänge des Lichtes unterscheiden die Fluoreszenz von allen anderen Formen der Lichtabsorption und -streuung, wobei die Spektralverteilung der Fluoreszenz weitgehend von der des erregenden Lichtes unabhängig bleibt.

Der Begriff der Fluoreszenz entspricht im allgemeinen dem der Photolumineszenz, da eine Abgrenzung zur Phosphoreszenz noch nicht einheitlich definiert ist (8) und die nur geringfügigen Unterschiede auf medizinischem Gebiet bedeutungslos sind.

Bei der Lumineszenzmikroskopie bietet die Betrachtung fluoreszierender Präparate den Anblick selbstleuchtender Strukturen auf schwarzem Grunde. Dabei wird nicht das vom Präparat durchgelassene, also nicht absorbierte, Licht betrachtet, da das die Fluoreszenz erregende Licht mehr oder minder vollständig beseitigt wird und nicht zur Abbildung benutzt werden kann. Zu seiner Beseitigung werden Sperrfilter in den mikroskopischen

Strahlengang gebracht, die einerseits verhindern, dass das zur Fluoreszenzanregung benötigte ultraviolette Licht Augenschädigungen verursacht und andererseits eine Überstrahlung der meist schwachen Fluoreszenz durch das sichtbare Spektrum des Erregerlichtes verhindern (Fig. 1).

Bei analytischen Untersuchungen, die zuweilen die Anwendung von Sperrfiltern verbieten, kann der Ausschluss des erregenden Lichtes auch durch die Beobachtung im Dunkelfeld erfolgen, wobei jedoch Streulicht - vor allem bei erheblicher optischer Inhomogenität im Präparat - ausserordentlich stören kann. Wo eine möglichst vollständige Ausschaltung des Erregerlichtes erwünscht ist, kann die kombinierte Anwendung von Dunkelfeldkondensor und Sperrfilter vorteilhaft sein. Für die visuelle Betrachtung genügen meist einerseits sogenannte Erregerfilter, die das zur Fluoreszenzanregung gewünschte Spektrum aus der Gesamtstrahlung der Lichtquelle herausfiltern, und andererseits komplementär gefärbte Sperrfilter, die das Erregerlicht im Abbildungsstrahlengang durch Absorption vernichten. Da das Erregerwellenlicht kurzwelliger sein muss als das Fluoreszenzlicht, kann Blau- und Grünfluoreszenz nur durch ultraviolettes, Gelb- und Rotfluoreszenz auch durch blauvioletttes Licht erregt werden.

Nur kleine Teile der eingestrahnten Lichtenergie werden in Fluoreszenzstrahlung umgewandelt; insofern erfordert die Fluoreszenzmikroskopie starke Lichtquellen mit besonders hoher Emission im kurzwelligen Bereich (Quecksilberhöchstdrucklampen). Wie die Eigenfarbe eines Stoffes von der Durchlässigkeit oder Reflektion des nicht absorbierten Anteiles des Lichtspektrums bestimmt wird, so hängt auch die Fluoreszenzfarbe vornehmlich vom physikalisch-chemischen Aufbau des Stoffes ab. Fehlende oder vorhandene Fluoreszenz wie auch die Affinität zu fluoreszenzfähigen Farbstoffen gestatten analytische Aussagen in gleicher Weise wie die verschiedenen in Histologie und Cytologie gebrauchten Farbstoffe.

Als Fluochrome besonders geeignet erwiesen sich:

Basische Farbstoffe wie Auramin, Acridinorange, Berberinsulfat, Coriphosphin, Eucrysin, Rivanol, Trypyflavin.

Neutrale lipophile Farbstoffe wie Rhodamin B sowie

Saure Farbstoffe wie Fluoreszein, Thiazinrot, Sulforhodamin, Primulin.

Von besonderer diagnostischer Bedeutung ist die Metachromasie, weil sie nicht nur quantitative sondern auch qualitative histochemische Aussagen ermöglicht.

Diachrome Farbstoffe erfordern zur Sichtbarmachung von Gewebstrukturen intrazelluläre Farbstoffkonzentrationen zwischen 1:100 und 1:1000. Stoffwechselabhängige Änderungen im histochemischen Aufbau einer Zelle sind daher angesichts der geringen Konzentrationsunterschiede des Farbstoffes mit einfachen Färbungen nicht zu erkennen. Demgegenüber ermöglichen Fluochrome bereits bei Konzentrationsunterschieden von 1:50 000 die Erkennung von Zellen und Organellen, woraus sich für die histochemische Diagnostik wesentlich neue Möglichkeiten ergeben.

Nachdem bereits zum Ausgang des Mittelalters von MONARDES über Fluoreszenzerscheinungen an Extrakten des blauen Sandelholzes berichtet war, entdeckte GRIMALDI 1665 ähnliche Erscheinungen an der Rinde des Rosskastanienbaumes und ^{an} anderen Naturprodukten. Die Untersuchungen am Flußspat (Fluorit) in verschiedenen Mineralien durch BREWSTER (1833) und HERSCHEL (1945) führten zu der heute noch gebräuchlichen Namensgebung.

Die Ursache dieses Phänomens erkannte zuerst STOKES (1852) in Veränderungen der Lichtwellenlänge. 1888 wies LIEBERMANN auf die Beziehungen zwischen der Fluoreszenz und der chemischen Konstitution eines Stoffes hin, was zu systematischen Untersuchungen führte, die unsere heutigen Kenntnisse über die Elektronenstrukturen der Atome und der einfachen Moleküle wesentlich beeinflussten.

Nachdem um die Jahrhundertwende in Frankreich die Cytodiagnostik seröser Höhlen durch WIDAL und RAVOUT (22) und in Deutschland die Ultraviolett-mikroskopie durch KÖHLER und v. ROHR eingeführt worden war, entdeckte 1904 KÖHLER bei Untersuchungen an lebenden Zellen die kontrastreiche Abhebung von Strukturen am Zellkern im ultravioletten Licht. Bald gelang dann der Nachweis, dass

diese Erscheinung auf einem besonders starken Absorptionsvermögen der Nucleinsäuren wie auch der Aminosäuren der Eiweisse (CASPERSSON) beruhte, wobei das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 m μ , das der Eiweisse bei 280 m μ lag.

In den folgenden Jahren erschienen dann zahlreiche Arbeiten, vornehmlich auf dem Gebiete der Pflanzenphysiologie und Bakteriologie, die sich ausschliesslich mit den primären Fluoreszenzen befassten. Die Verwendung von Fluochromen wurde erstmalig 1932 durch JANCZO (11), FISCHER und SCHWENK (7) zur Vitalfärbung von Trypanosomen versucht und von HAITINGER (10) zusammenfassend dargestellt. EPPINGER (6) gewann mit dieser Methodik neue Erkenntnisse über die Gewebespermeabilität. Eine zweite Periode der fluoreszenzmikroskopischen Forschung begann mit der Untersuchung fluochromierter Zellen, wobei STRUGGER (19) das Acridinorange zu Studien an lebendem und totem Pflanzenmaterial und KÖLBEL (13) zu quantitativen Untersuchungen an Hefezellen benutzte. Die Ergebnisse führten zur Auffindung der pH-Abhängigkeit der Fluochromierung sowie der Abhängigkeit der Fluoreszenzfarbe von der Konzentration des Fluochroms in wässriger Lösung. Dabei zeigt Acridinorange mit zunehmender Konzentration einen Umschlag von grün über gelb und orange zu kupferrot. Darüber hinaus wird Acridinorange vom toten Protoplasma besonders intensiv aufgenommen, stärker als andere basische Farbstoffe. Totes Protoplasma zeigt unterhalb des isoelektrischen Punktes eine grüne Fluoreszenz, während oberhalb eine starke Elektroadsorption des Farbstoffes und somit eine kupferrote Fluoreszenzfarbe auftritt. Lebendes Protoplasma speichert Acridinorange im extrem sauren Bereich nicht, jedoch lässt sich ab pH 4 sowohl im Plasma als auch im Kern eine grüne Anfärbung beobachten. Sie verstärkt sich mit abnehmender Azidität der Farblösung. Eine kupferrote Fluoreszenz erscheint im lebenden Protoplasma niemals, auch nicht nach tagelanger Überfärbung in konzentrierten Farblösungen. Hierin beruht die Möglichkeit, unter Einhaltung bestimmter pH - Bedingungen lebendes von totem Protoplasma zu unterscheiden. Dabei geht die Empfindlichkeit der Acridinorange-Methodik so weit, dass kleinste, mit Mikronadeln gesetzte Insulte, eine streng lokalisierte, ins rötliche veränderte sekundäre Fluoreszenz aufweisen. Lebendes Protoplasma

besitzt nur eine beschränkte Einlagerungsfähigkeit für Acridinorange. Die mit dem Absterben verbundene Denaturierung der Eiweisskörper zerstört das geordnete Eiweissmizellargerüst und schafft ein für die Absorption von Kationen offenes System. Die für die Botanik erarbeitete Methodik der Acridinorange-Fluochromierung erwies sich unter angepassten Reaktionsbedingungen auch auf tierisches und menschliches Gewebe anwendbar. Menschliche Herzmuskelzellen verhalten sich bei Anwendung isotonischer gepufferter Farblösungen wie Pflanzenzellen. Völlig abweichend hiervon aber speichern Carcinomzellen Acridinorange in weit höherem Masse als alle anderen Zellen (16). Besondere Beachtung verdienen SCHÜMMELFEDER's (18) histochemisch analytische Untersuchungen an Nucleinsäuren, in denen er am Kleinhirngewebe die Acridinorange-Fluoreszenz mit der für Nucleinsäuren - unter bestimmten Bedingungen - spezifischen Gallocyanin-Chromalaunfärbung sowie der nur die Desoxyribonucleinsäure (DNS) darstellenden Methylgrünfärbung verglich.

Gepufferte Acridinorangelösungen im Bereich von pH 0.65 - 1.5 lassen ebenso und in gleicher Intensität wie Gallocyanin-Chromalaunfärbungen eine mit zunehmender Wasserstoffionenkonzentration abnehmende Fluoreszenz ausschliesslich an den nucleinsäurehaltigen Zellstrukturen erkennen. Höhere pH-Werte bis 8 bewirken auch an nucleotidfreien Gewebsselementen eine zunehmende Farbbindung. Dementgegen zeigt die hochpolymere Desoxyribonucleinsäure der Zellkerne nur bis pH 2 eine Erhöhung, ab pH 3 hingegen eine zunehmende Verminderung der gebundenen Farbstoffmenge. In den letzten Jahren vertreten L. und F.v.BERTALANFFY (1) auf Grund ihrer vornehmlich auf dem Gebiete der gynäkologischen Cytodiagnostik mit der Acridinorange-Fluochromierung gemachten Erfahrungen die Ansicht, dass sich durch kurzfristige Färbung mit einer auf pH 6 gepufferten Acridinorangelösung DNS und Ribonucleinsäure (RNS) spezifisch different anfärben: An in Äther-Alkohol fixierten Gewebsabstrichen soll sich die DNS durch ihre grüne Fluoreszenz von der RNS mit ihrer braunorangenen oder feurigroten Fluoreszenz färberisch entsprechend ihrer Farbstoffabsorption trennen lassen. Angesichts der beträchtlichen Vermehrung der cytoplasmatischen RNS in Proliferierenden, insbesondere Tumorzellen, soll es in

einem als "Prescreening" bezeichneten Verfahren mit einer Treffsicherheit von 90 - 95% möglich sein, krebsunverdächtige Ausstriche auf Grund ihres Mangels an "roten Zellen" leicht und rasch auszumustern. Für krebsverdächtige Ausstriche wird eine anschließende Auswertung nach der Methode PAPANICOLAOU' s empfohlen. In den letzten Monaten wurde von verschiedenen Seiten erhebliche Kritik an BERTALANFFY's Veröffentlichungen geübt, weil Rotfluoreszenz nicht selten auch in benignen und fehlende Rotfluoreszenz in Tumorzellen anzutreffen ist. Entgegen den Angaben BERTALANFFY's , dass sich in über 90% aller Zervikal-ausstriche nach seinem Verfahren als negativ eliminieren lassen, fanden BONTKE u.M. (2) sowie WELLMANN (21) rotfluoreszierende Zellen bei 70 -75% aller benignen Fälle.

Neue Möglichkeiten für die Tumordiagnostik brachte die erst in den letzten Jahren an Autopsie- und Operationspräparaten entdeckte Affinität des Tumorgewebes für Tetracyclin. (15). Beim Versuchstier kommt es nach oraler wie auch parenteraler Tetracyclin-applikation in den ersten sechs Stunden in allen Geweben mit Ausnahme des Gehirnes makroskopisch zu einer kräftigen Gelb-Fluoreszenz im UV.-Licht. Nach 24 Stunden ist Tetracyclin nur noch in den Knochen, der Leber, in Teilen des Darmes und in Tumorgewebe nachweisbar, in den folgenden Tagen ausschliesslich in Tumorgewebe und Knochen. Auch das aus Tumorascites gewonnene Zentrifugat zeigt diese Gelbfluoreszenz. Bei der Maus war die Tetracyclin-Fluoreszenz in 14 von 19 verschiedenen Tumorarten (allen Sarkomen und Carzinomen, einigen Lymphomen und Leukämien) nachweisbar. Mc. Leay (14) wandte die Tetracyclinfluoreszenz 1958 auf die Tumordiagnostik beim Menschen an: er verabfolgte Tetracyclin (500 mg 6 - stündlich oral oder 12 - stündlich i.v.) Patienten mit gutartigen wie mit bösartigen Tumoren bis spätestens 12 Stunden vor der Operation. Bei allen histologisch als Carzinom gesicherten Tumoren fand er im Operationspräparat eine intensive Gelbfluoreszenz, nicht hingegen in histologisch gutartigen Tumoren. Die Intensität der Fluoreszenz ging dabei der Höhe des Tetracyclin-Blutspiegels weitgehend parallel. Andererseits zeigten die einzelnen Tumoren eine unterschiedliche Affinität zum Tetracyclin. Die stärkste Fluoreszenz wiesen

diejenigen Tumorbereiche auf, die histologisch eine besonders intensive Zellaktivität erkennen liessen. Die langanhaltende Speicherung von Tetracyclin erfolgt anscheinend nur - abgesehen vom wachsenden Knochen - in bösartigem Tumorgewebe, jedoch nicht in normalem oder entzündlichem Gewebe, auch nicht in gutartigen Tumoren. VASSAR u. M. (20) wandten 1960 erstmalig für die durch Tetracyclin induzierte Fluoreszenz neben der makroskopischen Betrachtung der Gewebe im UV - Licht auch die Fluoreszenzmikroskopie an. Auch sie fanden langanhaltende Fluoreszenz nur bei malignen Tumoren, während Hautulcerationen nur eine geringgradige und schnell verblassende Fluoreszenz, besonders im Schorf, erkennen liessen. Als Träger der Fluoreszenz fanden sie in Ausstrichpräparaten wie in Gefrierschnitten ausschliesslich Makrophagen und Gewebstrümmer im Stroma des Tumorgewebes, jedoch niemals die eigentliche Krebszelle. Ausschlaggebend scheint demnach für die Speicherung des Tetracyclins das Ausmass der Gewebsdestruktion und der hierdurch hervorgerufenen Histiozyten-Aktivität zu sein, wofür auch die geringe und kurzdauernde Fluoreszenz in gutartigen Läsionen und im Schorf sprechen. Unerklärt bleibt jedoch noch die fast selektive Trans- und Exsudation in Gewebsabschnitte mit abnorm gesteigerter Zellaktivität.

Die Tetracyclin-Fluoreszenz kann auch zur Diagnostik des Magen-carzinoms herangezogen werden (12); nach oraler Verabfolgung erscheint im Sediment des Magensaftes bei Carzinomträgern noch nach 30 Stunden in einem hohen Prozentsatz eine makroskopisch deutliche Gelb-Fluoreszenz.

B. Methodik

Der ausserordentlich schnelle Eintritt der Cytolyse erfordert bei allen cytologischen Untersuchungen von Ergüssen aus Körperhöhlen ein rasches Arbeiten. Im nicht zentrifugierten Exsudat lassen sich bereits nach maximal zwei Stunden Zelldestruktionen an den Granulozyten nachweisen. Carcinomzellen hingegen sind wesentlich stabiler. Die längste Überlebensdauer besitzen Mesothelien und Histiozyten.

Günstig für die Beurteilung eines Ausstrichs ist ein möglichst zellreiches, von Koagulationen freies Präparat, weshalb das Zentrifugieren besondere Aufmerksamkeit erfordert. Bei eiweissreichen Ergüssen verhindert auch ein Zusatz von Heparin (0.5 ml auf 100 ml Punktat) nicht mit Sicherheit Koagulationen, sodass nach Möglichkeit körperwarmes Punktat in vorgewärmten Zentrifugenröhrchen verarbeitet werden sollte. Tourenzahl und -dauer dürfen nicht schematisch angewandt werden, da ein klares Transsudat erheblich längere Zentrifugierzeit erfordert, als ein schnell sedimentierendes eitriges oder hämorrhagisches Exsudat. Im Höchstfall werden 1000 U/min über 4 Minuten benötigt. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn das Sediment sich in einer etwa stecknadelkopfgrossen Kuppe gerade abzusetzen beginnt und dieses dann vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt wird.

Zur Fluochromierung werden benötigt:

Eine Stammlösung von Acridinorange 0.1%ig, die vor Gebrauch mit einer isotonischen Pufferlösung pH 6 (Titrisol "Merck" oder $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 / \text{Na OH}$) im Verhältnis 1:10 verdünnt wird. Schwankungen des pH-Wertes haben nur geringe Farbunterschiede zur Folge; unterhalb pH 3 jedoch verschwindet die Rotfluoreszenz. Bei wesentlich höherer Wasserstoffionenkonzentration kommt es an Stelle der normalerweise polychromatischen Färbung zu einem Überwiegen der roten Farbtöne.

Die verdünnte Farblösung wird erst auf dem Objektträger dem Sediment etwa im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Eine Paraffinummantelung ist für die Präparatdurchmusterung entbehrlich, muss jedoch bei fotografischen Aufnahmen vorgenommen werden, weniger

um das Austrocknen zu verhindern als um Bewegungsunschärfen zu vermeiden. Trotz der Anwendung von Wärmeschutzfiltern kommt es bei nicht fixiertem Deckgläschen durch lokale Temperaturunterschiede zwischen dem im Strahlengang des Kondensors befindlichen Abschnitt und den übrigen Teilen des Präparates zu häufig recht lebhaften Zellströmungen. Zur Fluochromierung fixierter Ausstriche wurde die von BERTALANÉFY angegebene Methode angewandt, jedoch nicht, wenn Tetracyclinfluoreszenz zu erwarten war, da die Äther-Alkohol-Fixierung eine völlige Löschung der Tetracyclinfluoreszenz bewirkt. Luftgetrocknete Ausstriche oder Gefrierschnitte lassen hingegen keine Minderung dieser Fluoreszenz erkennen. Beleuchtungsverhältnisse und Strahlengang im Mikroskop gehen aus Fig. 1 hervor. Das UV-Licht wird in der neu entwickelten Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 200 W 2 erzeugt, die sich gegenüber dem Allstrombrenner durch den stabileren Lichtbogen und höhere Lichtausbeute auszeichnet. Zur Absorption des längerwelligen Lichtspektrums erwiesen sich die beiden Blau-violettfilter BG 3 und BG 12 mit einer Durchlässigkeit in den Wellenlängen zwischen 250 nm und 480 nm bzw. 350 nm und 500 nm als gleichwertig. Kurzwelliges UV-Licht selektierende Filter gestatten bei der Acridinorange-Fluochromierung nur geringe Fluoreszenzausbeute. Als Sperrfilter wurde ein Kantenfilter mit einer Durchlässigkeit von 530 nm aufwärts verwandt.

Hinsichtlich der Belichtungsdauer wurden neue Wege erprobt. Die bisher empfohlene empirische Ermittlung der Belichtungszeit erwies sich angesichts der zu häufigen Fehlbelichtungen als ungeeignet. Das rasche Erlöschen insbesondere der Rotfluoreszenz erlaubt bei der Vitalfluochromierung nur selten mehr als eine Aufnahme, sodass Belichtungsreihen nicht durchgeführt werden können. Hierin liegt wahrscheinlich auch der Grund für die bisher fast ausnahmslose Verwendung fixierter Präparate, bei denen sich eine Stabilisierung der Fluoreszenz durch kurze Behandlung mit 1%iger Essigsäure erzielen lässt. Eine Verwendung der üblichen Belichtungsmesser ist nicht möglich, da alle im Mikroskop eingebauten oder auf das Okular aufzu-

setzenden fotoelektrischen Belichtungsmesser ausnahmslos auf das Integral der das Präparat durchdringenden Lichtmenge reagieren, die bei cytologischen Untersuchungen jedoch fast ausschliesslich von Zahl und Grösse der fluoreszierenden Einzelzellen abhängt. Die Intensität des Erregerlichtes kann, da es durch Sperrfilter fast vollständig abgedeckt wird, für eine Belichtungsmessung nicht verwertet werden.

Für unsere fotografische Dokumentation gingen wir zur Ermittlung der Belichtungszeit nach folgendem Verfahren vor: wir belichteten eine fotografische Platte zunächst derart, dass nach^{der} Entwicklung das eine Ende völlig geschwärzt, das andere in kontinuierlichem Übergang durchsichtig wurde. Abstufungsfehler liessen sich mit Farmerschem Abschwächer leicht korrigieren. Durch Abschneiden eines Streifens erhielten wir so einen Verlaufsfilter, der in den Filterschlitz des Optovars am Zeiss-Mikroskop eingeschoben wurde. Am Filter angebrachte Markierungen gestatteten, die durch Vorversuche ermittelte richtige Belichtungszeit festzustellen. Die Ablesung erfolgte, wenn sich beim Verschieben des das Verduchtsfeld verdunkelnden Verlaufsfilters erste Zellumrisse abzuzeichnen begannen. Da ein derartiger Verlaufsfilter nicht im Handel erhältlich ist, musste er selbst hergestellt werden.

Die Schwierigkeiten bei der quantitativen Helligkeitsmessung an der Einzelzelle ergeben sich aus der auf kleinsten Raum beschränkten ausserordentlich geringen Lichtdichte, wobei die Ergebnisse durch unterschiedliche Farbtemperaturen einer erheblichen Beeinflussung unterliegen. Photodioden und Photozellen sind auf Grund ihrer selektiven Empfindlichkeit im roten bzw. blauen Spektralbereich nicht geeignet, ebenso wenig Photowiderstände, da sie das Maximum der spektralen Empfindlichkeit bereits bei 700 nm erreichen. Wir benutzten daher für die Helligkeitsmessung ein Selenelement, bei dem sich durch Filtervorschaltung eine der menschlichen Retina ähnliche Farbsensibilität erzielen lässt. Der grosse Nachteil dieses Selenelementes liegt in der sehr kleinen Stromabgabe, die sich im Gegensatz zu anderen fotoelektrischen Bauelementen nicht durch Vorlegen einer Spannung steigern lässt. Der Fotostrom, der ausschliesslich durch das von einer Einzelzelle ausgestrahlte Fluoreszenzlicht erzeugt wird, muss, um hochempfindliche Messinstrumente

mit einer Ablesemöglichkeit von einem Mikroampère aussteuern zu können, auf etwa 1:1000 verstärkt werden. Ferner musste ein extrem kleines Selenemet angefertigt werden, (ca. 3mm^2), da zur Ausleuchtung der kleinsten handelsüblichen Selenelemente (10mm Durchmesser) stärker vergrößernde Objektive mit grösserer Linsenzahl erforderlich gewesen wären, wodurch sich die Lichtausbeute weiter verringert hätte.

Figur 2 zeigt das Schaltbild eines für die Fluoreszenzlichtmessung entwickelten zweistufigen Transistorverstärkers, der auf dem Prinzip der elektrischen Waage beruht. Ein einstufiger Transistorverstärker erwies sich auf Grund unzureichender Verstärkerwirkung (maximal 250fach) für die Helligkeitsmessung an der Einzelzelle als nicht ausreic~~h~~^{en}d. Eine Weiterverstärkung durch zusätzliche Stufen ist jedoch nicht möglich, da Germanium-Transistoren mit hohem Verstärkungsfaktor ausserordentlich empfindlich auf Temperaturschwankungen und Restströme reagieren und bereits die Aussteuerung durch das Selenelement eine ständige Verschiebung des Nullpunktes bedingt. Im eigenen Gerät wird die Stabilisierung dadurch erreicht, dass der Fotostrom nicht direkt, sondern ~~die~~ durch Ansteuerung der Basis zweier sonst spiegelbildlich gleichgeschalteter Transistoren entstehende Spannungsdifferenz verstärkt wird.

Das bei der Fluoreszenzmikroskopie erzielte optische Bild ist bei Acridinorange-Fluochromierung zwar polychromatisch, doch zeigen die Helligkeitswerte in den einzelnen Farben nur geringfügige Unterschiede. Daraus ergeben sich bei der Schwarz-Weiss-Reproduktion kaum bildwirksame Kontraste. Zur Dokumentation ist daher stets die Farbmikrofotografie anzustreben. Hierzu wird bisher fast ausschliesslich der Farbumkehrfilm benutzt. Die eigenen Erfahrungen lassen es ratsam erscheinen, dem Negativ-Farbfilm den Vorzug zu geben, und zwar aus folgenden Gründen:

Schwierigkeiten in der Belichtungsmessung sowie Fluoreszenzlöschung erfordern einen Film mit möglichst grossem Belichtungsspielraum, worin der Negativ-Film dem Umkehrfilm überlegen ist. Die im Handel befindlichen Kleinbildfarbfilme sind durchweg auf erhebliche Helligkeitskontraste im Bildobjekt abgestimmt und

haben daher weicharbeitende Emulsionen. In der Farbmikroskopie aber sind geringe Farbkontraste die Regel, sodass eine steilere Graduation im Negativ in höchstem Masse wünschenswert ist. Bei der Benutzung des Umkehrfarbfilmes entfallen also alle bei der Schwarz-Weiss-Fotografie gegebenen Möglichkeiten zur Kontraststeigerung, wie die Verwendung von Kontrastfiltern bei der Aufnahme, kontraststeigernde Entwicklungsmethoden und die Benutzung von hart arbeitendem Negativ- und Positivmaterial. Beim Negativfilm kann durch einfache Abwandlung der Entwicklungsvorschriften (längeres Verweilen im Farbentwickler) eine erhebliche Steigerung des Farbkontrastes erzielt werden. Eine Farb-Mikrofotografie erfordert, um die Leistungsfähigkeit des Farbfilms ausnutzen zu können, eine individuelle Entwicklung im eigenen Fotolabor, wobei im Gegensatz zum Umkehrfilm die Entwicklung eines Negativfilmes nicht wesentlich mehr Mühe als die eines Schwarz-Weiss-Filmes bereitet. Die Gesamtbearbeitungszeit beträgt etwa 50 Minuten, von denen allein 30 Minuten auf die ohne Beaufsichtigung durchzuführende Wässerung entfallen.

Die Herstellung farbiger Vergrößerungen ist beim Umkehrfilm ausschliesslich in Speziallaboratorien möglich, da nur sie vom Handel mit entsprechenden Colorpapieren und Entwicklungschemikalien beliefert werden. Die farbrichtige Wiedergabe der mikroskopischen Objekte ist aber nur durch Korrektur des Mikroskopierenden selbst möglich, da Colorpapiere regelmässig mit erheblichen Farbstichen behaftet sind, die von einer Emulsionsnummer zur anderen in ihren drei Farbkomponenten erheblich differieren. Farbverfälschungen, wie sie durch Fehler in der Belichtungszeit, durch Farbstiche in der Film- oder Papieremulsion oder im Entwicklungsvorgang bedingt sein können, lassen sich leicht durch Farbfilter auf dem visuellen Eindruck entsprechende Farbwerte korrigieren.

Vergrößerungen von Fluoreszenzaufnahmen durch den Handel fallen meist unbefriedigend aus, da die in den Entwicklungslaboratorien für den Kopier- und Vergrößerungsvorgang verwendeten Belichtungsmesser ebenso wie die mikroskopischen Belichtungsmesser nur die integrierte Bildhelligkeit vermitteln. Es entstehen somit bei der Reproduktion gleiche Schwierigkeiten wie sie oben schon für die Belichtungsmessung im Fluoreszenzmikroskop erläutert worden sind. Gute Dienste leistet auch

unter dem Vergrößerungsapparat das oben angegebene Verfahren zur Helligkeitsmessung mittels eines elektronischen Verstärkers, mit dem sich die Helligkeit der Einzelzelle bestimmen lässt. Die Ermittlung von Belichtungszeiten durch die vom Schwarz-Weiss-Verfahren her bekannte unterschiedliche Entwicklung eines Probestreifens ist ausserordentlich zeitraubend, da zumeist die Belichtungszeit von Bild zu Bild geändert werden muss und eine Beurteilung des sich im Entwicklungsvorgang befindlichen Papiers frühestens nach 15 Minuten möglich wird. Colorpapiere haben nur einen geringen Belichtungsspielraum. Die Entwicklung bei fast völliger Dunkelheit schliesst ein vorzeitiges Abbrechen der Entwicklung im Falle einer Fehlbelichtung aus, zumal in der Schicht befindliches Silber, das erst später im Bleichbad entfernt wird, die entstehenden Farben stark überdeckt.

C. Klinische Ergebnisse

Ziel der Arbeit war vornehmlich die Entwicklung einer Methodik zu fluoreszenzmikroskopischen Studien an der lebenden Zelle und deren Dokumentation, insbesondere in der cytologischen Tumordiagnostik. Auf eine umfangreiche Kasuistik soll daher zunächst verzichtet werden. Die Leistungsfähigkeit der Methodik wird daher lediglich an einigen Beispielen demonstriert. Die Beurteilung der Punktatausstriche erfolgte ausschliesslich nach Gestalt und Farbe der fluoreszierenden Zellen, während von einer histochemischen Deutung bewusst Abstand genommen wurde. Wenn übereinstimmend in allen die Acridinorange-Fluoreszenz der Tumorzellen betreffenden Veröffentlichungen der letzten Jahre angenommen wird, dass die Metachromasie dieses Farbstoffes eine spezifische Trennung zwischen DNS und RNS ermöglichte, so muss ich bekennen, dass es mir trotz intensiven Quellenstudiums nicht gelungen ist, die experimentelle Beweisführung dieser Aussage in der Literatur zu entdecken. Zumeist wird dabei auf eine Arbeit SCHÜMMELFEDER's verwiesen (17), nach der bei kurzer Färbung mit Acridinorange-Lösungen bei pH 6 eine unterschiedliche Fluoreszenzfarbe an der DNS und RNS zu beobachten ist. Der einschränkende Zusatz, dass saure Mucopolysaccharide auch leuchtend rot und nucleinsäurefreie Gewebsteile grün, also in den gleichen Farben wie die beiden Nucleinsäuren, fluoreszieren, ist dabei offensichtlich in Vergessenheit geraten. Überdies besteht im quantitativen Verhalten zwischen DNS und RNS keineswegs immer eine so signifikante Verschiebung, dass daraus allgemeingültige Aussagen über die Gut- oder Bösartigkeit eines Gewebes möglich wären.(5).

Bei der Beurteilung eines Punktates bedarf es einer Differenzierung von Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten, und Monozyten), von Histiozyten, Mesothelien sowie von " Tumorzellen". Die Erkennung von Blutzellen bereitet nach Fluochromierung im allgemeinen keine besonderen Schwierigkeiten. Die Kerne zeigen hier wie bei allen vitalen Zellen stets eine leuchtend gelbgrüne bis grüne Färbung. Im Protoplasma der Granulozyten finden sich zahlreiche, in dem der Lymphozyten nur ein bis zwei rote Granula. Eine Unterscheidung zwischen Granulozyten und Lymphozyten hat in sofern an differentialdiagnostischer Bedeutung verloren, als neuerdings nachgewiesen werden konnte, dass in spezifisch lymphozytären Ergüssen

(wie bei der Tuberkulose) zunächst stets die Granulocyten überwiegen und erst mit zunehmendem Alter des Ergusses relativ abnehmen (9). Erythrocyten zeigen weder Primär- noch Sekundärfluoreszenz und erscheinen daher ohne Eigenfärbung - den verwendeten Filtern entsprechend - dunkler oder heller als das umgebende Medium. Histiocyten sind durch auffallend rote, scharf begrenzte Granulationen charakterisiert, die denen der Granulocyten ähneln, jedoch deutlich grösser sind. Das Plasma selbst lässt dabei nur eine sehr schwache oder gar keine Fluoreszenz erkennen. Die Zellkerne, die meist rund aber auch monocytoid gelappt sein können, werden nur selten von den roten Granula überlagert. Eine ausgeprägte Polymorphie ist den Mesothelien eigen. Protoplasma und Zellkerne können in ihrer Grösse ausserordentlich variieren. Der Zellkern enthält meist ein bis vier Nucleolen. Ihr Protoplasma umschliesst oft mannigfaltig gestaltete, oft abnorm grosse Vakuolen, wodurch es zur Bildung typischer Siegelringzellen kommen kann. Häufig liegen sie in Zellverbänden zusammen oder bilden polynucleäre Riesenzellen und bieten dadurch oft morphologisch das gleiche Bild wie Tumorzellen. Die Vorzüge der Acridinorange-Vitalfluochromierung liegen in der guten Differenzierbarkeit der Mesothelien, da sich die Mehrzahl dieser Zellen meist mit einem Blick durch ihre charakteristische Anfärbbarkeit erkennen lässt. Im Gegensatz zu SCHUMMELFE DER (16), der an fluochromierten Endothel- und Bindegewebszellen keine Fluoreszenz des Protoplasmas beobachten konnte, fanden wir als augenfälligstes Kennzeichen der meisten Mesothelzellen eine intensive plasmatische Rotfluoreszenz in Gestalt zahlreicher kleiner bis kleinster, oft konfluierender Granula, die häufig auch den Zellkern vollkommen überdeckten. Je dünner das Präparat ist, um so deutlicher wird am Kern eine scharf abgegrenzte Membran sichtbar.

Entgegen der Ansicht BRANDENBURG's (3), dass es eine der Kritik standhaltende Unterscheidungsmöglichkeit von Tumorzellen und Mesothelien in den Ergüssen seröser Höhlen nicht gibt, fanden wir deutliche Unterscheidungsmerkmale (Abb. 19 - 21, 23, 24, 29). Beim Durchmustern eines vitalfluochromierten Präparates ist es in den meisten Fällen leicht möglich, die Abstammung der

polymorphen tumorzellähnlichen Degenerations- und Reizformen der Mesothelien auf Grund der Übergangsstufen zur Masse der uniformierten Serosadeckzellen festzustellen. Tumorzellen lassen sich sicher erkennen, wenn sie als relativ einheitliche Zellpopulation mit den typischen Zeichen der Malignität auftreten und eine mesotheliale Herkunft durch das Fehlen von Zwischenformen ausgeschlossen werden kann. Diese Bedingungen aber sind fast stets bei Ergüssen maligner Genese gegeben. Als Zeichen der Malignität können dabei gewertet werden:

1. Kernpolymorphie, Anisokaryose
2. Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Kernes, wobei jedoch Vakuolen nicht in das Plasmavolumen einbezogen werden dürfen.
3. Nucleolen-Vergrößerung und -Verformung (Schlauch- und Sternformen) wobei das Verhältnis Nucleolus : Kern größer als 0.22 sein muss.
4. Auftreten von körperähnlichen Strukturen innerhalb der Nucleolen.
5. Gehäuftes Auftreten von Zellen, deren Vakuolen ein rot-fluoreszierendes Sekret enthalten.
6. Abnorme Mitosen.
7. Einkernige Riesenzellen mit Nucleolen-Vergrößerungen und -Verformungen.
8. Mehrkernige Riesenzellen, deren Wachstum in drei Dimensionen erfolgt.

Die von uns untersuchten Tumorzellen aus Ergüssen zeigen ebenso wie Tupfpräparate von Primärtumoren und Metastasen in ihrer Anfärbbarkeit gegensätzliche Eigenschaften zu den Mesothelien. In vitalfluochromierten Ausstrichen fallen besonders bei kleiner Vergrößerung Tumorzellverbände durch das Überwiegen grüner Farbtöne auf, während die oft in Haufen gelagerten Mesothelien als orangene Zellkomplexe imponieren. Beim Adenocarcinom gibt eine homogene Rotfluoreszenz in den stark vakuolisierten Zellen sowohl auf Grund ihrer Lokalisation als auch infolge der Färbung keinen Anlass zu Verwechslungen. Die Fixierung des Ausstriches mit Ether-Alkohol bewirkt eine

Umkehr im färberischen Verhalten von Tumorzellen und Mesothelien. Das Protoplasma der Tumorzellen zeigt nun fast regelmässig eine kräftige rot- bis orangefarbene Fluoreszenz, während die Endothelzellen eine nur sehr schwache rotbraune Fluoreszenz in schaumig-strukturiertem Protoplasma aufweisen. Nach der Fixierung haben wir mit fluoreszierendem Sekret gefüllte Vakuolen in keinem Fall mehr beobachten können.

Bei unseren Untersuchungen an Einzelzellen und Geweben mit Tetracyclin vorbehandelter Patienten konnten wir die auf diesem Gebiete erschienenen Veröffentlichungen nur teilweise bestätigen. Bei intra- und supravitaler Tetracyclinfluochromierung sahen wir die typische Gelbfluoreszenz in der Einzelzelle fast ausschliesslich an die Mikrosomenstruktur gebunden. Die Unterschiede zwischen malignen und benignen Gewebe bestanden weniger in der Permanenz als in der Intensität der Tetracyclinfluoreszenz. In den Stauungsergüssen gutartiger Hepatopathien sowohl als auch denen herzkranker Patienten war eine Gelb-Fluoreszenz in Einzelzellen über 24 Stunden hinaus - meist noch nach zwei bis drei Tagen-erkennbar. Charakteristische Veränderungen liessen sich jedoch im Pleuraexsudat und Ascites von Trägern eines Adenocarcinoms finden: hier kam es in einzelnen der bei dieser Tumorart häufig auftretenden rosettenförmigen Zellkomplexe zu einer Intensität der Fluoreszenz einzelner Zelleinlagerungen, die der des reinen Tetracyclins entsprach. Diese Einlagerungen traten sowohl nach peroraler als auch nach intravenöser oder intraperitonealer Verabfolgung auf. Sie zeigten erhebliche Grössenunterschiede von feinsten Körnelungen bis zu grobkolligen Zelleinschlüssen. Wir bezeichneten sie in Anlehnung an CHLOPLIN (4), der erstmalig die Bildung intraplasmatischer Granula unter dem Einfluss basischer Farbstoffe beschrieben hat, als Krinome. Die zur Zeit geltende Vorstellung, dass die Krinombildung in zwei Phasen abläuft, wobei es zunächst zu einer diffusen Fixation des Farbstoffes an ribonucleinsäurehaltige Plasmabestandteile kommt, und erst dann das Krinom durch Konzentration entsteht, stimmt auch mit unseren Beobachtungen überein. Bei nachträglicher Fluochromierung krinomhaltiger Zellen mit Acridinorange-

Lösungen wurde die Tetracyclin-Fluoreszenz gelöscht. Eine Wiederanfärbung dieses Bezirkes gelang weder durch Acridinorange noch durch eine erneute Färbung mit Tetracyclinlösungen.

D. Zusammenfassung.

Nach Schilderung der histor^{über}ischen und physikalischen Grundlagen der Fluoreszenz wird/eine eigene Methodik zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung und photographischen Dokumentation berichtet, die eine rasche und genaue Differenzierung von Zellen in Ergüssen der serösen Höhlen zulässt.

Für die Routinediagnostik erweist sich die supravitale Acridinorange-Fluochromierung besonders geeignet, da sie ausser einer unverfälschten Darstellung aller wesentlichen Zellstrukturen häufig auch Rückschlüsse über deren Funktion und die Vitalität zulässt. Die von Bertalanffy für die Tumordiagnostik empfohlene differente Anfärbung von Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure in fixierten Ausstrichen lässt sich nach unseren Beobachtungen nicht verwerten, da vitale Tumorzellen und Mesothelien trotz gleichen Nucleinsäuregehaltes eine Umkehr in ihrem färberischen Verhalten zeigen. Nach Applikation von Tetracyclin fanden wir nicht nur in Zelltrümmern und Karzinomstroma lang anhaltende Speicherung dieses Fluochroms, sondern auch in der Tumorzelle selbst.

E. Literaturverzeichnis

1. Bertalanffy, L. v.
u. F.D. v.Bertalanffy Die Fluoreszenzmethode in der
Zytodiagnostik des gynäkologischen
Karzinoms.
Med. Welt 35: 1742-1751 (1961)
2. Bontke, E., G. Kern u.
N. Schümmelfeder Die Acridinorange-Fluochromierung in
der gynäkologischen Zytodiagnostik.
Geburtsh.u.Frauenhk. 20: 24-34 (1960)
3. Brandenburg, W. Die Multipotenz des Mesothels.
(Fischer-Jena 1953) S. 27-48
4. Chloplin, N. Arch.exp.Zellforsch. 4: 462 (1927)
5. Davidson, I.N. The Biochemistry of the Nucleic Acids.
(Methuen-London 1960) S. 78-92
6. Eppinger, H. Permeabilitätspathologie.
(Springer-Wien 1949) S. 116-118
7. Fischel, U. u. E. Schwenk Fluoreszenzmikroskopie als chemo-
therapeutische Forschungsmethode.
Klin.Wschr. 11: 1114 (1932)
8. Förster, Th. Fluoreszenz organischer Verbindungen.
(Vandenhoeck u. Ruprecht-Göttingen
1951) S. 1-281
9. Grunze, H. Klinische Zytologie der Thoraxkrank-
heiten.
(Enke-Stuttgart 1955) S. 687-689
10. Haitinger, M. Fluoreszenzmikroskopie. Ihre Anwendung
in der Histologie und Chemie.
(Akad.Verlagsanstalt-Leipzig 1938)
11. Jancso, N. Beobachtung chemotherapeutischer
Vorgänge im Fluoreszenzmikroskop.
Klin.Wschr. 11: 689 (1932)
12. Klinger, J. u. R. Katz Tetracycline Fluorescence in Diagnosis
of Gastric Carcinoms.
Gastroenterology 41: 29-32 (1961)
13. Kölbel, H. Quantitative Untersuchungen über die
Speicherung von Acridinorange in
lebenden und toten Hefezellen und ihre
Beziehungen zu den elektrischen Ver-
hältnissen der Zelle.
Z.Naturforsch. 2: 381 (1947)
14. Mc. Leay, J.F. The Use of Systemic Tetracyclines
and Ultraviolet in Cancer Detection.
Amer.J.Surg. 96: 415-419 (1958)
15. Rall, D.P., Ti Li Loo,
M.Lane and M.G.Kelly Appearance and Persistence of
Fluorescent Material in Tumor Tissue
after Tetracycline Administration.
J.nat.Cancer Inst. 19: 79-85 (1957)

16. Schümmelfeder, N. Die Fluochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmas mit dem basischen Farbstoff Acridinorange und ihre Beziehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. Virchows Arch. 318: 119-154 (1950)
17. Schümmelfeder, N,
K.J. Ebschner u.
H.E. Krogh Die Grundlage der differentiellen Fluochromierung von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure mit Acridinorange. Naturwiss. 44: 467-468 (1957)
18. Schümmelfeder, N.,
H.E. Krogh u.
K.J. Ebschner Färbungsanalysen zur Acridinorange-Fluochromierung. Histochemie 1: 1-28 (1958)
19. Strugger, S. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. (Schäfer-Hannover 1949) S. 52-89
20. Vassar, P.S., A.M.Saunders
and C.F.A. Culling Tetracycline Fluorescence in Malignant Tumors and Benign Ulcers. Arch.Path. 69: 613-616 (1960)
21. Wellmann, K.F. Kritische Bemerkungen zur Akridinorange-Fluochromierung in der zytologischen Krebsdiagnostik. Med.Welt 40: 2100-2102 (1962)
22. Widal, E. et P. Ravaut Cytologie des Épanchements séreux. Presse méd. 9: 189 (1901)

Abb. 1 E.P. 48 J. Haemorrhagischer Pericard-Erguss. Histiocyt mit Lymphocyten. Der Histiocyt ist durch grobkörnige Granula im Plasma gekennzeichnet, die sich bereits wenige Sekunden nach Fluochromierung kräftig rot anfärben. Das Protoplasma fluoresziert sehr schwach dunkelgrün, der Kern leuchtend mittelgrün. Acridinorange
800 x

Abb. 3 M.M. 59 J. Ascites. Ein Histiocyt, dessen Kern zwei kleine Nukleoli zeigt, ist von den umgebenden Tumorzellen durch die spezifischen grobkörnigen Granulationen deutlich unterscheidbar. Acridinorange
500 x

Abb. 5 Gleiches Präparat. Einschichtig wachsender Verband mesothelialer Riesenzellen, Lymphocyten und Granulocyten. Kennzeichnend für die Kerne der Mesothelien ist hier die scharf abgegrenzte Kernmembran, sowie die unregelmässig im Kern gelagerte Anordnung der Nucleoli. Acridinorange
300 x

Abb. 7 E.L. 63 J. Ascites bei Lebercirrhose. Mesotheliale Riesenzelle, deren drei linksgelegene Zellkerne im Absterben begriffen sind: Strukturlosigkeit des Kernes, Gelbverfärbung (zunächst im Nucleolus erkennbar). Acridinorange
500 x

Abb. 2 gleiches Präparat. Histiocyt: Bemerkenswert ist die Polymorphie der histiocytären Zellkerne (rund, oval, monocytoid gelappt). Zwei Lymphocyten mit gelbgrünen Kernen und dem nur zart anfärbbaren, 1-2 rote Granula enthaltenden Protoplasma. Ein segmentkerniger Granulocyt: Gelbgrüner Kern. Die leuchtend roten plasmatischen Granula liegen ausserhalb der Grennebene und erscheinen verschwommen. Acridinorange
800 x

Abb. 4 E.T. 66 J. Pleuraexsudat bei Pleuropneumonie. Mehrkernige mesotheliale Riesenzelle, einige Granulocyten. Die Riesenzelle weist wie die meisten Mesothelien in ihrem Protoplasma zahlreiche kleine bis kleinste, z.T. konfluierende orangefarbene Granula auf. Acridinorange
300 x

Abb. 6 Gleiches Präparat. Mesotheliale Riesenzelle, drei einzelne Mesothelien, Lymphocyten und Granulocyten. Abb. 3-6 zeigen mesotheliale Reizformen. (Riesenzellen, erhebliche Grössenunterschiede der Einzelzellen, die häufig auffällig wenig Granula besitzen). Acridinorange
300 x

Abb. 8 Gleiches Präparat. Vier Mesothelien in Siegelringform, wie sie sich nur in älteren Ergüssen, hier jedoch sehr häufig, finden. Acridinorange
300 x

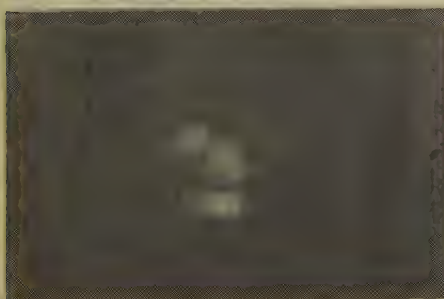
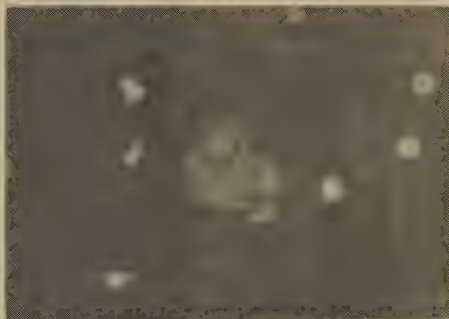
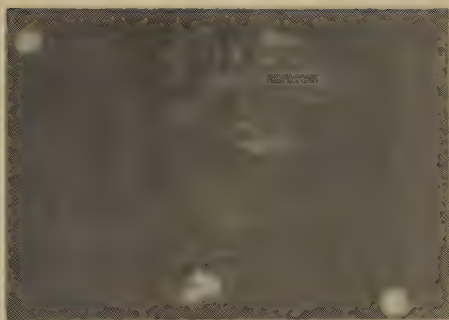
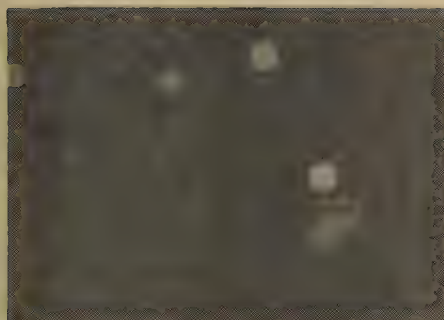


Abb. 9 E.H. 55 J. Pleuraexsudat bei Mesotheliom: Zahlreiche z.T. in Verbänden gelagerte Mesothelien. Links unten eine stark vakuolisierte Einzelzelle.

Acridinorange
500 x

Abb. 11 W.R. 60 J. Ascites bei Adenokarzinom des Magens: Zahlreiche unauffällige Mesothelien. Abb. 9 und 11 zeigen Mesothelien, wie sie in fast allen Ergüssen angetroffen werden. Bemerkenswert ist das ziemlich einheitliche färberische Verhalten der Granula, die zumeist trotz ausgeprägter Polymorphie der Einzelzelle eine Identifizierung auf den ersten Blick gestattet.

Acridinorange
500 x

Abb. 13 Gleiches Präparat. Drei Mesothelien. Zahlreiche Tumorzellen: Fast alle Zellen zeigen eine hochgradige Verschiebung der Kern-Plasmarelation zu Gunsten des Kernes. Die Nucleoli sind hochgradig vergrößert, wodurch bei einzelnen Zellen Mehrkernigkeit vorgetäuscht wird. Im Innern der Nucleolen werden kernkörperchenähnliche Strukturen abgebildet.

Acridinorange
300 x

Abb. 15 Gleicher Ascites. 250 mg Tetracyclin, 24 Stunden vor der Punktion i.v. verabfolgt, sind die Ursache der auf das Protoplasma, vornehmlich der Karzinomzellen, beschränkten Gelb-Fluoreszenz.

Nativ
300 x

Abb. 10 Gleiches Präparat. Die zentral gelegene Riesenzelle lässt durch Nucleoli und Zellmembran die mesotheliale Abkunft erkennen. Mehrschichtiges Wachstum sowie die monströse Form einzelner Zellkerne (rechts oben) sprechen für maligne Entartung.

Acridinorange
500 x

Abb. 12 Gleiches Präparat. Drei einkernige Riesenzellen mit deutlicher Vergrößerung des Nucleolus: Erheblicher Verdacht auf Malignität

Acridinorange
500 x

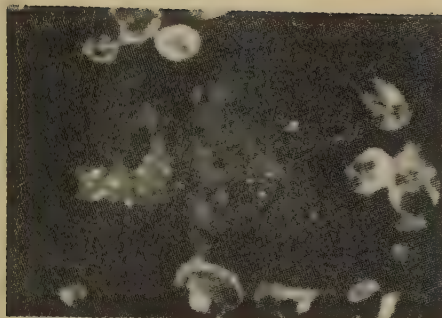
Abb. 14 Gleiches Präparat. Die zentralgelegenen Mesothelien von Abb. 13 und 14 erscheinen deutlich blasser und gelblicher als in Abb. 9 - 12. Die Farbunterschiede sind lediglich durch verschiedene Objektive bedingt, wobei der Oelimmersion-Apochromat rötlicher, niedrig vergrößernde Apochromaten gelblicher abbilden. Zahlreiche Tumorzellen.

Acridinorange
300 x

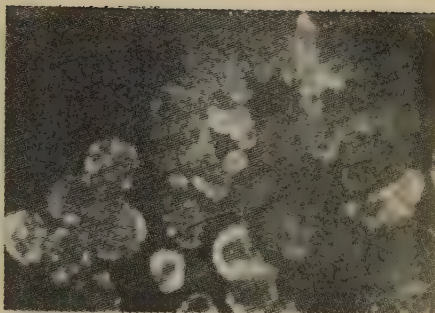
Abb. 16 Gleicher Ascites. Zwei Tumorzellen, zahlreiche Mesothelien. Die Tumorzellen fallen hier durch ihre Grösse, die Verschiebung der Kernplasmarelation und ihre Farbe auf. Die Mesothelien weisen ein etwas bräunlicheres Protoplasma auf, das vermutlich als Folge der Fixierung netzartig strukturiert erscheint.

(Fluochromiert nach Bertalanffy).
Acridinorange
300 x

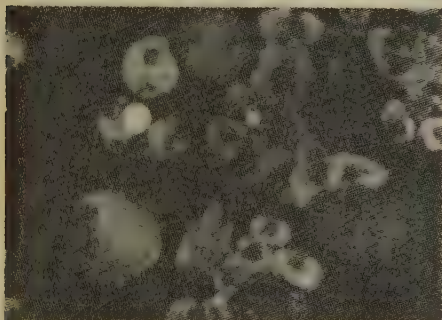
9



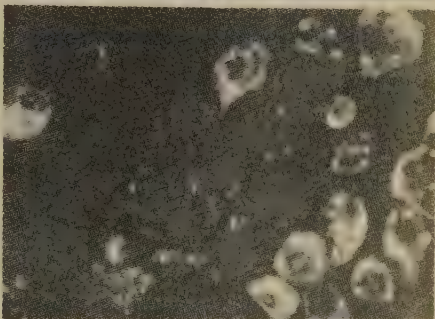
10



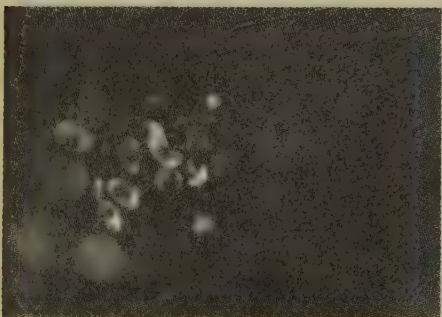
11



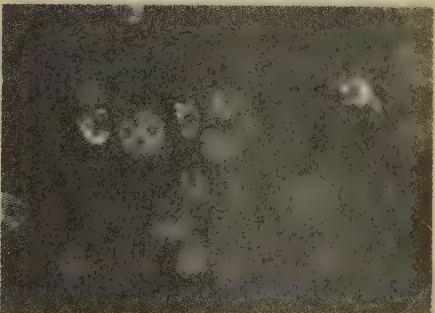
12



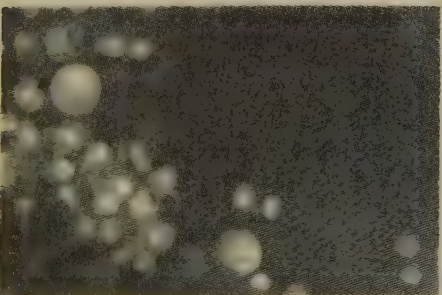
13



14



15



16

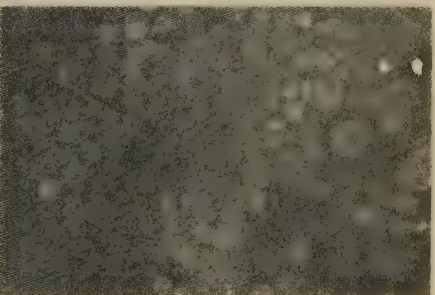


Abb. 17 M.M. 59 J. Pleuraexsudat bei Mammarkarzinom. Tumorzellen mit zuweilen mehrkammerigen Vacuolen. Einige dieser Vacuolen sind mit einem intensiv rotfluoreszierenden Sekret gefüllt.
Acridinorange
500 x

Abb. 19 Gleiches Exsudat, jedoch Alkoholäther-fixiert. Vacuolisierte Tumorzellen. Fluoreszierendes Sekret wie in Abb. 17 und 18 wird bei dieser Fixierung nicht dargestellt. Fluochromiert nach Bertalanffy.
Acridinorange
500 x

Abb. 21 Stärkere Vergrößerung. Die rosettenartige Wachstumsform der Tumorzellen in Ergüssen der serösen Höhlen ist beim Adenokarzinom charakteristisch.
Acridinorange
500 x

Abb. 23 "Tumor-Zellrosette" wie in Abb. 21: mit AO-Lösung durch Diffusion unter dem Deckgläschen nachträglich fluochromiert. Mit dem Eindringen der AO-Lösung wird die Selbst-Fluoreszenz augenblicklich gelöscht, in Krinomen konzentriertes Tetracyclin lässt sich als dunkle Einlagerung mit heller schalenartiger Umrandung auch weiterhin deutlich erkennen.
Acridinorange
500 x

Abb. 18 Gleiches Präparat. Unten eine zweikernige stark vacuolisierte Riesenzelle mit abnormen schlauchförmigen Nucleoli.
Acridinorange
300 x

Abb. 20 Gleiches Exsudat wie in Abb. 17 24 Stunden nach Tetracyclin i.v.. Die diffuse Anfärbung des Protoplasmas lässt in Rosettenform mehrdimensionales Wachstum der Tumorzellen erkennen. Anscheinend unabhängig von der plasmatischen Tetracyclinspeicherung bilden sich im Innern eines Zellhaufens krinomenähnliche Tetracyclineinlagerungen ab. Die Helligkeitsunterschiede beider Formen der Tetracyclinspeicherung betragen ca. 1:20 bis 1:100
Nativ
300 x

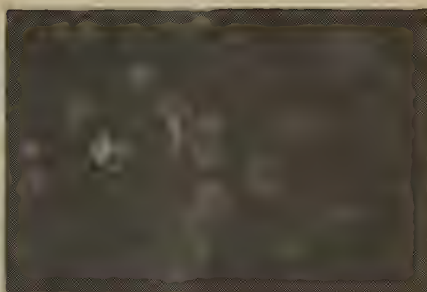
Abb. 22 Kupfpräparat einer Hautmetastase 24 Stdt. nach 500 mg Tetracyclin i.v. exstirpiert.
Nativ
500 x

Abb. 24 Gleiches Präparat wie Abb. 22. Nachfluochromiert wie in Abb. 23. Im rechten unteren Bildteil zahlreiche Tetracyclinkrinome. Zentral eine Vacuole mit homogener Rotfluoreszenz, wie in Abb. 17 u. 18.
Acridinorange
500 x

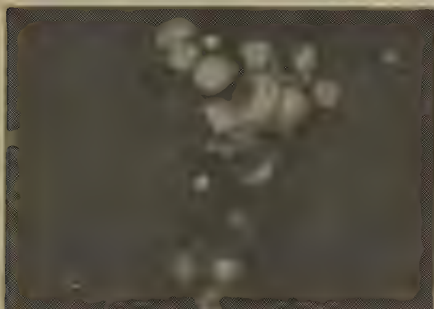
17



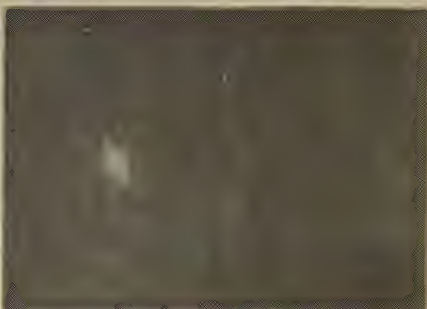
18



19



20



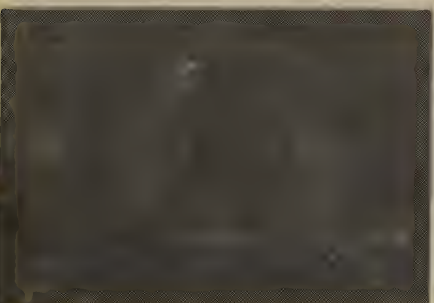
21



22



23



24



Abb. 25 M.R. 37 J.

Ascites bei metastasierendem Mammakarzinom. Zahlreiche Mesothelien z.T. einschichtig syncytial; die netzförmige Struktur des Protoplasmas wird in der Abbildung nur unvollkommen dargestellt.

(Fluochromiert nach Bertalanffy)
Acridinorange
500 x

Abb. 27 Gleicher Ascites:

Zentral ein mehrdimensional wachsender Tumor-Zellhaufen, dessen Kerne nur in den Randpartien abgebildet werden konnten, da die aperturbedingte Tiefenschärfe eine scharfe Darstellung nur in einer Ebene dieses Zellkomplexes zuließ. Links und rechts massenhaft Mesothelien mit charakteristischer Orange-Fluoreszenz der Plasmagranelationen.

Acridinorange
300 x

Abb. 29 Gleiches Präparat. Tumorzellen und Mesothelien. Die Tumorzelle rechts oben zeigt eine mondsichelförmige, rotfluoreszierendes Sekret enthaltene Vacuole. Offensichtlich ist diese Zelle aus einer Siegelringform durch zweimalige Teilung in die Vacuole entstanden. Dieser Vorgang ist nie bei Mesothelien zu beobachten, bei denen Vacuolisierung als Zeichen der Degeneration aufzufassen ist.

Acridinorange
300 x

Abb. 26 Gleiches Präparat:

Tumorzellhaufen. Oben deutlich vacuolisierte Zellen, unten eine mehrkernige Riesenzelle. (Fluochromiert nach Bertalanffy)
Acridinorange
500 x

Abb. 28 Gleiches Präparat. Auch

hier signifikante Unterschiede zwischen Tumorzellen und Mesothelien.
Acridinorange
300 x

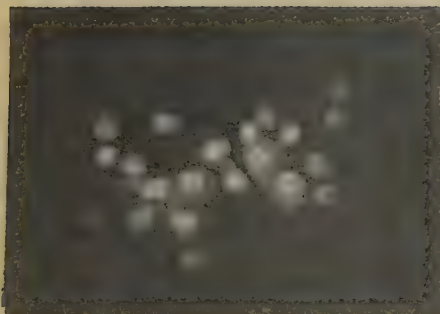
Abb. 30 Ascites der gleichen Patientin, postmortal entnommen. Tumorzellen und Leukocyten zeigen im Absterben unterschiedliches Verhalten. In vivo zugrundegehende Leukocyten zerfallen durch autolytische Peptisation. Die segmentierten Zellkerne quellen ohne Farbumschlag zu strukturelosen Scheiben auf und zerfließen dann zu einem Schatten, der sich laufend vergrößert und verdunkelt. Chemisch, thermisch oder mechanisch getötete Leukocyten sowie Tumorzellen lassen im Augenblick des Zelltodes einen signifikanten Farbumschlag erkennen (rotes Protoplasma, gelber Kern).
Acridinorange
300 x

Abb. 31 u. 32 G.G. 66 J.

Pleuraerguss bei metastasierendem Mammakarzinom 24 Stunden nach dreitägiger Prämedikation von 2x250 mg Tetracyclin i.v.. Kräftige diffuse Gelb-Fluoreszenz des Protoplasmas der Tumorzellen, jedoch keine Kriombildung. Die Mesothelien zeigen eine wesentlich schwächere Gelb-Fluoreszenz, die zudem unter der UV-Belichtung rasch abbläßt. Hämatogene Zellen lassen keinerlei Fluoreszenz erkennen.

Nativ
500 x

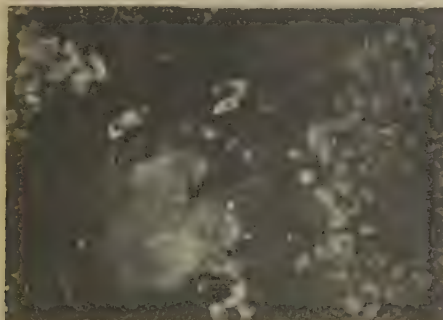
25



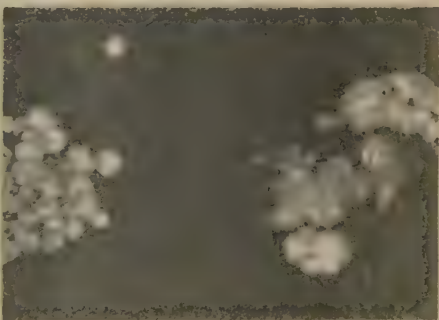
26



27



28



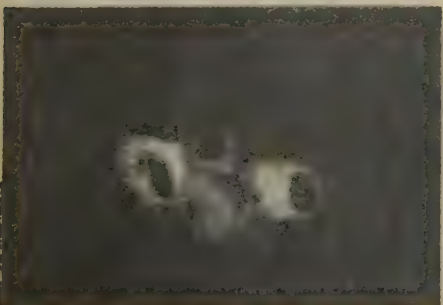
29



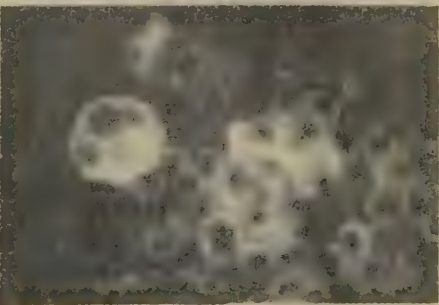
30



31



32



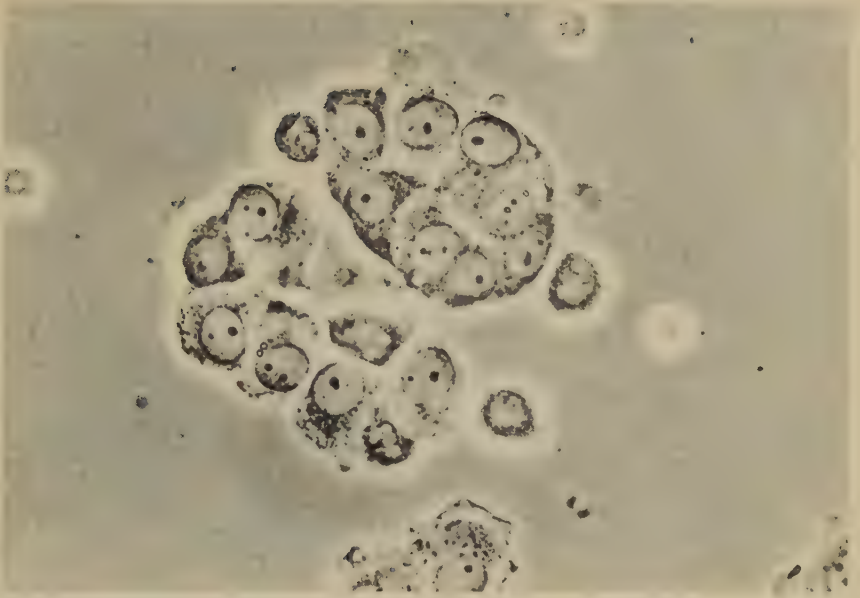


Abb. 33 Gleicher Erguss wie in Abb. 3 - 5
Mesothelien bei Pleuropneumonie
Phasenkontrast 750 x

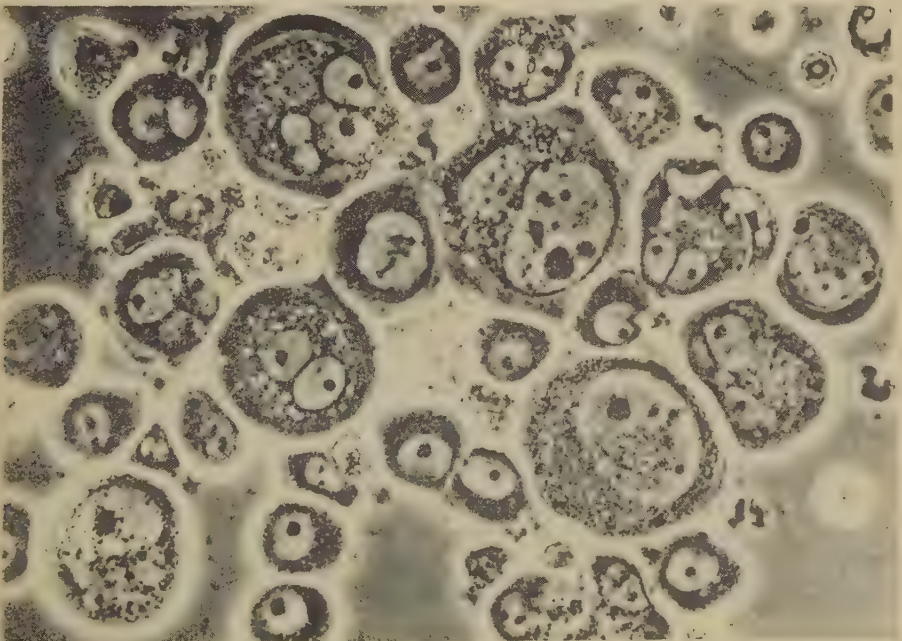


Abb. 34 Gleicher Erguss wie in Abb. 13 - 10
Tumorzellen bei metastasierendem Magenkarzinom
Phasenkontrast 750 x

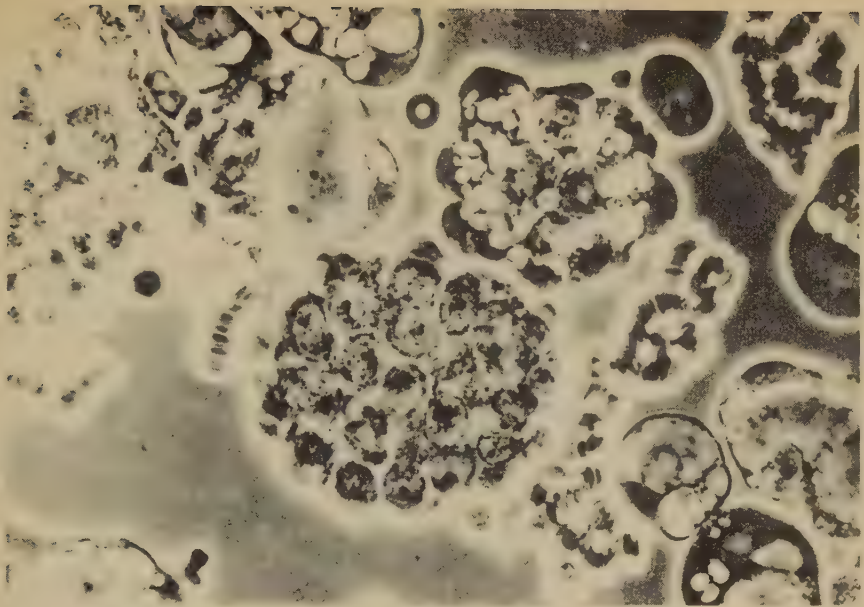


Abb. 35 Gleicher Erguss wie in Abb. 17 - 21
 Rosettenförmige Tumorzellverbände bei metastasierendem
 Mammakarzinom.
 Phasenkontrast 750 x

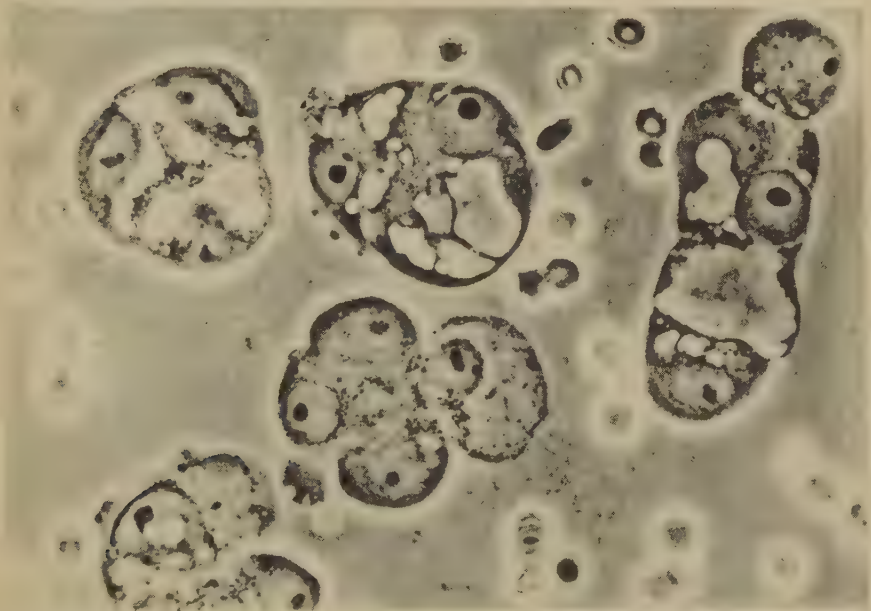


Abb. 36 Gleicher Erguss wie in Abb. 25 - 30
 Vakuolisierte Tumorzellen bei metastasierendem Mammakarzinom
 Phasenkontrast 750 x

G. Lebenslauf.

Am 16.1.1926 wurde ich als dritter Sohn des Studienrates Dr. Reinhard T h o m und seiner Ehefrau Johanna geb. Neesen in Berlin geboren. Die humanistische Schulbildung erhielt ich zunächst im Gymnasium zu Berlin-Steglitz, später im Conradinum-Danzig und letztlich im Joachimsthal'schen Gymnasium in Templin. Da die Ausbildung durch meine Einberufung zum Luftwaffenhilfsdienst unterbrochen worden war, absolvierte ich die Reifeprüfung als Extraner vor dem Staatlichen Prüfungsausschuss Berlin 1945.

Das im Wintersemester 1944/45 in Berlin begonnene Medizinstudium setzte ich nach Kriegsende in Greifswald, später in Leipzig fort und bestand dort am 2.8.1948 das Physikum mit der Note gut. Die klinische Ausbildung erhielt ich in der Charité und bestand dort am 16.8.1951 das Staatsexamen mit der Note sehr gut. Vom November 1951 an war ich in der Charité je 4 Monate als Pflichtassistent auf der Augen-, der Hals-Nasen-Ohren- und der Hautklinik tätig. Bis zur Vollapprobation, die am 15.4.1954 erteilt worden ist, arbeitete ich zunächst 6 Monate auf der Chirurgischen-, dann auf der Inneren Abteilung des St. Hedwigs-Krankenhauses Berlin, und blieb dort als Assistenzarzt bis März 1956. Im Anschluss, bis zum September 1961, war ich als Betriebsarzt, später als leitender Arzt im Ambulatorium der BVG, Berlin C 2, tätig.

Seit November 1961 bin ich mit der Wahrnehmung der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten an der I. Medizinischen Universitätsklinik betraut.

